

דו"ח מדעי שנתי לתוכנית מדען מסי' 261-0975-15

בנושא :

לימוד התכונה לאגירת Methyl Anthranilate והחדרתה לזני תות חדשים בטיפוח.

מאת :

עמיר וויל¹ (סטודנט למוסמך) עינת בר², זכריה תנעמי¹, עדנה בן אריה¹, אפרים לוינסון² וניר דאי¹.

¹ המחלקה לחקר ירקות וגד"ש, המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני

² יחידה לצמחי תבלין רפואה ובושם, נווה יער, וולקני

**Study the molecular control of Methyl anthranilate accumulation in
strawberry for breeding of high quality fruits.**

From:

Amir Weil¹, Einat Bar², Zecharia Tanami¹, Edna Ben Arie¹, Efraim Lewinsohn² and Nir Dai¹

¹ Departments of Vegetable and field crop research, Institutes of Plant Sciences,
Volcani Center,

² Institutes of Plant Sciences, Newe Ya'ar Research Center, Volcani.

Nir Dai E-mail: nirdai@volcani.agri.gov.il

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

_____ חתימת החוקר

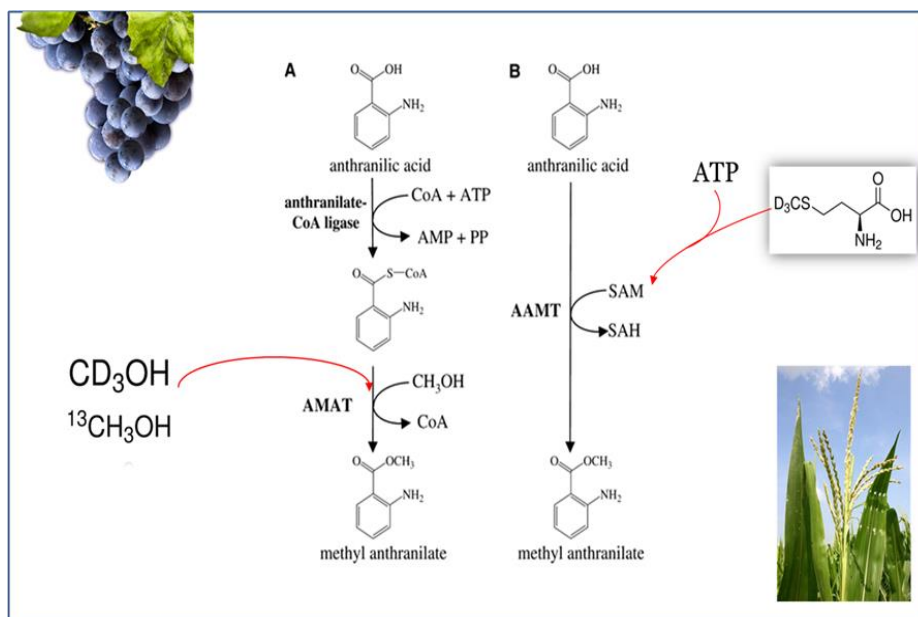
תקציר:

הצגת הבעיה: ארומת תות השדה היא ללא ספק אחד המרכיבים הראשיים הקובעים את איכות הפרי וייחודו. הנדיף, Methyl Anthranilate (MA), שכיח בתות הבר הדיפלואידי, אך כנראה נאבד במהלך התרבות והטיפול של המין *Fragaria x ananassa*. לאסטר MA ארומה אופיינית ורצויה המזכירה תות הבר ובעבודת מחקר וטיפול זה זנו עושים להעבירה לרקע מסחרי. נכון להיום ידועים שני זני תרבות אוקטפלואידיים האוגרים MA, ואחד מהם נמצא באוסף הזנים של מכון וולקני ומספרו 660. **מטרות:** בעבודה זו נשלב טיפוח בהיקף רחב להעברת התכונה לאגירת MA בפרי לרקע חקלאי מסחרי, עם לימוד המסלול הביוכימי בו מסונתז הנדיף ומציאת הגנים המבקרים אותו. **תוצאות המחקר:** בעונת 2015 נמצאו כבר מספר קווים המשלבים רמה מורגשת של MA עם צמחים יפים בעלי פירות אחידים בגודל בינוני עם חיי מדף משופרים בהרבה. הקווים MC32 ו MC38-8 נבחרו כטובים ביותר, אותם נגדל בשנה הבאה בחלקות חצי מסחריות בכדי לבדוק את ביצועיהם החקלאיים ואת תגובת הצרכנים לפרי המיוחד בעל ארומת ענבים. שלושת שנות הטיפול לארומה המיוחדת הוכיחו שדבר אפשרי אם כי איטי יותר מטיפול רגיל. ההורה התורם את התכונה מביא איתו הרבה תכונות שליליות ודרוש אוכלוסיות גדולות יותר והרבה צירופים כדי לחזור ולקבל קווים מסחריים האוגרים MA.

לאחר זיהוי המסלול הביוכימי בו מועבר מתיל מ SAM לחומצה האנתרנליטית (AA) ליצירת MA ככזה המתועד בתירס מצאנו גנים (AAMT) קנדידטים שתבנית ביטויים מקביל לסינתזת MA בפרי הזן 660 (איור 5). שלושת הגנים לא הראו פעילות עם חומצה אנתרנליטית לאחר ביטויים בחיידקים. במקביל נמצא בפלורידה הזן 04119 שכן מקטלו את העברת המתיל לחומצה אנתרנליטית מ SAM. ממצאי עבודה עולה כי פעילות הזן מתיל-טרנפראז זה, בצאצא ספציפי אינו מספיק בכדי לאגור MA ויש עוד גן שנמצא בהורה 660 שכנראה מבקר את צבירת החומצה האנתרנליטית כגורם מגביל נוסף לאגירת MA. כלומר צבירת חומצה אנתרנליטית (AA) בפרי היא הגורם המגביל הראשון ביכולת לסינתזה ואגירה של MA בפרי. בזנים המסחריים אין צבירת AA כלל ולכן אין סובסטראט לסינתזת MA בהם. השאלה מה גורם להצטברות AA בפרי עדין פתוחה ולימוד המסלול בו היא נוצרת בפרי נלמד בהמשך. סמן PCR, שהוכן, על סמך גן 04119 יכול לעזור באופן חלקי לברירת צאצאים בטיפול. ברירה טובה יותר בכלים מולקולריים תעשה רק לאחר מציאת הגן השני המבקר את תכונת האגירה וכך ברירת צאצאים המכילים את שני האללים החיוניים לצבירת MA בפרי תות שדה.

רקע: תות-שדה בר וזה התרבותי נמנים עם פירות הקינוח הפופולאריים ביותר הגדלים בכל העולם. ארומת תות השדה היא ללא ספק אחד המרכיבים הראשיים הקובעים את איכות הפרי וייחודו. אחד החומרים הנדיפים התורמים לארומת התות, אך נדירים ביותר ברקע מין התרבות *Fragaria x ananassa*, הוא האסטר Methyl Anthranilate (MA) המקנה לפרי ארומה פירותית המזכירה טעם ענבים. שילוב אנליזות של GC-MS ו GC-olfactometry עם מבחני ריח לקבוצת טועמים מיומנת בתות-שדה הגדירה את האסטר Methyl Anthranilate כנדיף חשוב המקנה ארומה ייחודית לתות-שדה. האסטר Methyl Anthranilate נמצא בענבים שחורים מסוג קונקורד מהמין *Vitis labrusca* ובמיני הבר של תות-שדה, בעיקר *Fragaria vesca*. Methyl Anthranilate מסונתז כימית בנקל ומשמש כתוסף מזון המקנה ריח של ענבים בסוכריות, משקאות קלים, מסטיקים, תרופות ומוצרי קוסמטיקה שונים.

למרות הערך האקולוגי והמסחרי של Methyl Anthranilate, קיים באופן יחסי מעט ידע על הסינתזה של חומר זה בצמחים. מידע ראשוני על מסלול זה התקבל בפירות של גפן שחורים מהמין *Vitis labrusca* (Wang and Da Luca, 2005). סינתזת Methyl Anthranilate קיימת כאמור גם בתירס, ומתרחשת בעלים כתגובה לאכילת העלים ע"י זחלים מהמין *Spodoptera* (Köllner et al., 2010). בשנה ראשונה של עבודה זו, הוכיח עמיר, שמסלול סינתזת MA בתות-שדה מתרחש בדומה לזו הקיימת בתירס, במסלול בו עוברת חומצה אנתרנליטית מתילציה ל MA כאשר תורם המתיל הוא SAM (מסלול B באיור למטה). בנוסף מצאנו בבדיקות האכלה, שהתכולה של החומצה האנתרנליטית בפרי עשויה להיות גורם מגביל בקבלת ואגירת האסטר MA בהבשלת הפרי. מידע זה יאפשר למקד את חיפוש ופיתוחו של סמן גנטי ככלי לזיהוי העברת התכונה לצאצאים ולעזרה בטיפוח של קווי תות שדה המכילים Methyl Anthranilate בעלי פוטנציאל מסחרי.



איור 1. מסלולי ביוסינתזה אפשריים של Methyl Anthranilate מ- Anthranilic acid בצמחים שונים. מסלול A מתועד בענבים שחורים מין קונקורד מהמין *Vitis labrusca*, ונבדק ע"י הוספת מתנול מסומן. בנוסף, מסלול B מתועד בתירס, ונבדק ע"י הוספת מתיונין מסומן.

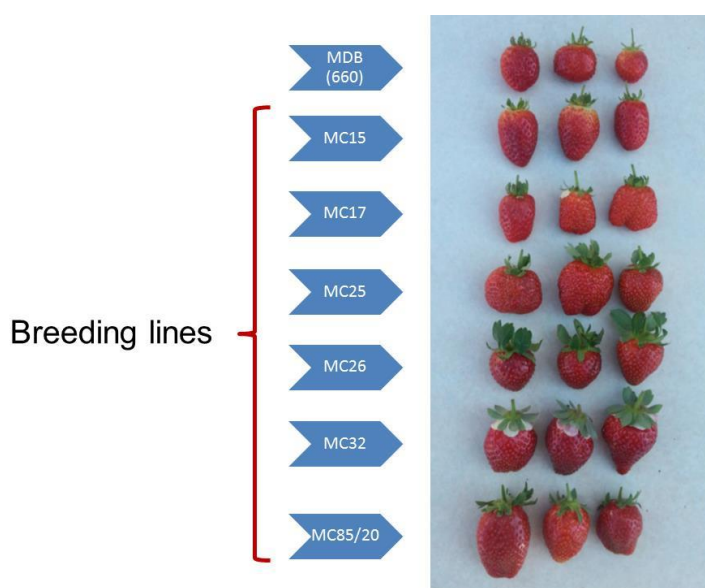
הנדיף, Methyl Anthranilate (MA), שכיח בתות הבר הדיפלואידי, אך כנראה נאבד במהלך התרבות והטיפוח של המין *Fragaria x ananassa*. נכון להיום ידועים מספר מוגבל זני תרבות אוקטפלואידיים האוגרים MA, ואחד מהם נמצא באוסף הזנים של מכון וולקני ומספרו 660. לאסטר MA סף חישה נמוך (3 ppb) ולכן כאשר תכולתו בינונית או גבוהה הוא מורגש ומוסיף לפרי ארומה אופיינית המזכירה תות הבר. בשנים אחרונות גידלנו בחממת בית דגן ובמושב צופית חלקות קטנות של הזן 660 ונתנו דוגמאות לקהל מגוון של טועמים. למרות גודלו הקטן של הפרי מרקמו הרך ותכולת הסוכר



איור 2. מראה הזן 660 המכיל MA לעומת הזן המסחרי "שני".
 לזן 660 פירות קטנים ורכים, ללא חיי מדף. פירות הזן 660 כמות שהם אינם ניתנים לשיווק ומסחור.

קטנים ורכים ללא חיי מדף המופיעים בגלי יכול דלים ביותר. באיור 2, אפשר לראות את פירות הזן המסחרי שני לעומת פירות הזן הצרפתי 660, שבמקרה הטוב מתאים באופיו לגידול בחוות קטיפה עצמי אך לא לגידול ושיווק מסחריים.

ארומת תות-שדה היא יעד קשה במהלך הטיפוח רגיל, ולרוב איכות הפרי וריחו אינם נמצאים בין מטרות הטיפוח הראשיות. סיבה זו גרמה לקבלת זנים חדשים בעלי יכול רב, פרי גדול וחיי מדף טובים



אבל פירות שאופיינו לעיתים בריח חלש. בעבודה זו, אנו סיימנו כיום את השנה השלישית של הכלאות וסלקציות וכבר אפשר לראות כיוון של קווים טובים יותר (תמונה משמאל) בעלי פרי בינוני אחיד ועסיסי, הניתן לאריזה ושיווק ומכיל מינונים יפים של ה MA הרצוי. שני הזנים שהובאו מחו"ל, Holiday ו Northester שהו הרבה זמן בקרנטינה ולא נכנסו להכלאות של 2015. תכנית טיפוח ייחודית זו כבר מושכת התעניינות

מסחרית רבה ואנו מאמינים שהגדלת מספר הכלאות ונפח הטיפוח, יאפשרו בשנים הקרובות ברירת ובחינת קווים מתקדמים יותר בדרך לזן מסחרי בעל הטעם המבוקש.

מטרות לשנה זו

א. ביצוע תוכנית טיפוח המשלבת:

1. אנליזת GC לקווים מתקדמים מספר פעמים במשך העונה ולימוד יציבות של תכולת MA בפרי.
2. גידול מס' גדול יותר של קווי טיפוח ולימוד תכונות הצמח והפרי לאורך עונת הגידול.
3. בחינת 1000 זריעים נוספים, תוצרי 22 הכלאות בין חצאי אחים המכילים את האסטר MA.
4. המשך ביצוע תכנית הכלאות המשלבת קווים נבחרים בחממת וולקני.
5. חזרה להכלאות F1 של הזן 660 וקווים נבחרים עם זנים מסחריים.

ב. המשך לימוד המסלול הביוכימי בו נוצר Methyl Anthranilate בתות שדה.

ג. בחינת גנים קנדידטים מקבוצת ה SABHAT לפעילות של מתיל טרנסראז וכמבקרים את סינתזת MA בתות-שדה.

תוצאות הטיפוח

באוקטובר 2015 נשתלו בחממת השדה במכון 57 קווים לבחינה מתקדמת ו 1000 זרעים צאצאי הכלאות של חצאי אחים המכילים MA. הצמחים התבססו ונסרקו למגוון תכונות צמח ופרי. בחודשי החורף והאביב נסרקו הזריעים ע"י צוות הטיפוח ונלקחו דוגמאות לאנליזת GC לאימות נוכחות ורמת הנדיף. לקווים שנבחרו משנה קודמת תועדו: מבנה הצמח, מראה הצמח, מועד פריחה גודל הפרי. כמו כן נעשתה סריקה לנוכחות הנדיף ע"י טעימה של צוות מיומן ובמקביל נדגמו פירות מצמחים רבים לאנליזת GC וקביעת תכולת MA.

תכולת MA בקווים נבחרים

טבלה 1. מסכמת את תכולת MA בפירות קווי הטיפוח כפי שחושבו לאחר אנליזות GC-MS. דוגמאות פרי נאספו בתאריכים השונים מחממת תות-שדה בוולקני ומחלקות השדה במשק טל בהוד השרון כפי המופיע בטבלה. בתהליך הסריקה ובירור הקווים במהלך הטיפוח נסרקו עוד עשרות קווים, וכ- 200

טבלה 1. תכולת האסטר Methyl Anthranilate בקווי טיפוח מתקדמים שנבררו בתקופת המחקר. כל קבוצות הקווים גדלו בעונת 2015-2016 בחממת תות-שדה במכון וולקני ובמקביל בחלקות טיפוח מסחריות במשק טל בהוד השרון. פירות בשלים נאספו במהלך העונה, נכתשו בחנקן נוזלי והוכנו לאנליזת GC-MS. אנליזת GC נעשתה בנווה יער. ערכי התכולה חושבו ע"י סטנדרט של β -heptanon שהוסף לדוגמא ומובאים כ PPB.

קו טיפוח	25.12.15	1.2.16	10.2.16	16.2.16	22.2.16	2.3.16	29.3.16	31.3.16	6.4.16
	וולקני	וולקני	משק טל	וולקני	וולקני	משק טל	משק טל	וולקני	משק טל
MC 660	135				156				
MC15	200	0	7		447	33		741	3751
MC18	46	0					46	154	145
MC32		0			57			26	506
MC37-65			154				272		707
MC38-8		0			85	10	9	0	32
MC38-48		0			95	86		78	64
MC43-72				8				166	
MC44-1				860			319	1664	124
MC46-4		0			78			152	165
MC46-33				313					85

דוגמאות GC. על אף, שלא דגמנו את כל הקווים בכל המועדים, אפשר לראות שתכולת הנדיף MA משתנה לאורך העונה. בחודשי החורף, ינואר ופברואר יורדת התכולה בפירות ואף נעלמת כליל בכל הדוגמאות של ה-1 לפברואר השנה (טבלה 1). עד היום ידענו, שביטוי התכונה ותכולת הנדיף אינם אחידים ומושפעים מתנאי סביבה וצמת. בפעם ראשונה, בעונה הנוכחית, למדנו, שבמועדים מסוימים לא הצטבר MA כלל. כך בתחילת פברואר ולהערכתנו גם בינואר (רק מטעימות לא נבדק ב GC) לא נמצא MA גם בקווים הידועים כגבוהים כדוגמת MC15. תכולת הנדיף מושפעת ככל הנראה מטמפי גידול אבל צבירתו מושפעת כנראה באינטראקציה עם גורם נוסף שאינו ידוע. מאמצע פברואר והתחממות הימים אפשר לראות עליה הדרגתית בתכולת הנדיף בפרי. עליה משמעותית נוספת מתרחשת באביב החם לקראת סוף מרץ ובמהלך אפריל. תכולת הנדיף מושפעת מאוד מדרגת הבשלה ולכן הבדל אמיתי נראה לפי הצבעים המציגים ערכים הגבוהים פי 5 בין צבע לצבע בטבלה 1. כל הקווים, שנבחרו ומוצגים הטבלה, יעברו בעונה הקרובה אנליזות GC, בריקס, גודל פרי, ויבול מסודרים וכך יהיה אפשר לעמוד על גורמים נוספים המשפיעים על צבירת MA בפרי.

תכונות הצמח והפרי של קווים נבחרים

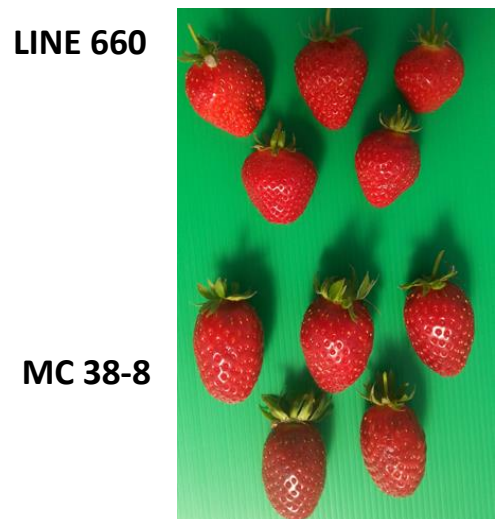
בטבלה למטה מסוכמים מופעי הצמח והפרי של הקווים שבחרנו להמשך הטיפול. אפשר לראות שרוב הקווים אינם מצרפים תכונות מספיקות בכדי להפך למסחריים ולכן ישמשו בהמשך הטיפול כהורים להורשת התכונה לאגירת הנדיף MA. בהמשך הטיפול נשלב הכלאות בין אחים והכלאות של הקווים עם זנים מסחריים איכותיים נוספים.

קו טיפוח	מופע צמח	מופע פרי
MC 660	צמח קומפקטי, מפוצל, עוקצים קצרים, פרי מוסתר, גלי	פרי בינוני – קטן, סביבוני, בהיר ורך מאוד
MC 15	צמח פתוח, זקוף, עוקצים בינוניים, גלי	פרי בינוני – גדול, לא אחיד, רגיש, כהה ורך,
MC 18		פרי בינוני – קטן, אחיד, כדורי, בהיר, מבריק ועסיסי
MC 32	צמח פתוח מאוד, זקוף, עוקצים זקופים, נח לקטיף, גלי	בינוני, שטוח, מבריק, עסיסי, עיוותי קצה, ע. גביע קטנים
MC 37-65	צמח קומפקטי, פתוח, עוקצים זקופים, נוח לקטיף	פרי קטן+, בהיר, ביצתי
MC 38-8	צמח מפוצל צפוף, פרי מוסתר, אינו גלי	פרי בינוני יפה, ביצתי ומאורך, אדום כהה, מוצק, מבריק ואחיד
MC 38-48	צמח מפוצל צפוף, פרי מוסתר, אינו גלי	פרי ביצתי יפה ומאורך, הקטן במקצת מ-38-8, אדום כהה, מוצק, מבריק ואחיד
MC 44-1	צמח גדול זקוף ומפוצל, פרי מוסתר	פרי קטן, מעוגל, בהיר ודי אחיד
MC 46-4	צמח קומפקטי, עוקצי פרי ארוכים	פרי קטן, כהה, אחיד ומבריק
MC46-33	צמח קומפקטי, עוקצים ארוכים ופרי חשוף.	פרי בינוני, כהה, לא אחיד ובעל זרעים בולטים.

באיור 3 אפשר לראות את פירותיהם של מספר קווי טיפוח בהשוואה לזן תורם התכונה 660 (MDB). פירות הזן 660 קטנים כאמור ופירות קווי הטיפוח גדולים ולעיתים אחדים יותר בצורתם. הקווים MC32 ו MC38-8 מכילים רמה גבוהה ומורגשת של הנדיף MA. בנוסף, קווי הטיפוח לא נפלים בבריקס מהורה 660, קצת פחות חמוצים ממנו ומשקלם הממוצע עדיף (איור 3).

		Brix%	pH	Fruit weight	MA PPB
Breeding lines	MDB (660)	8.4	3.25	12.3	70
	MC85	7.7	3.55	21.8	2.5
	MC32	8.5	3.3	26.4	34
	MC40-84	8.6	3.2	28	n.d.
	MC38-8	9.5	3.4	18.5	41

איור 3. קווי טיפוח לאגירת MA בהשוואה לזן 660 למעלה. בטבלה מימין מספר מדדי איכות כגון: %בריקס, חומציות, משקל פרי ורמת MA.



איור 4. קווי טיפוח MC32 ו MC38-8 בהשוואה לזן 660 למעלה. קווים ראשוניים אלו גדולים ומוצקים יותר מהזן 660.

לסיכום: בסוף השנה השלישית של הטיפוח, יש בידינו מספר קווים אם יתרון מוכח על הזן ההורה 660.

זיהוי מסלול הביוסינתזה של Methyl Anthranilate בתות-שדה

- נושא זה התקדם וסוכם בשנתיים הראשונות של המחקר. להלן **מסקנות המחקר אליהן הגענו:**
1. מסלול סינתזת MA בתות-שדה מתרחש בדומה לזו הקיימת בתירס, במסלול בו עוברת חומצה אנתרנליטית מתילציה ל MA כאשר תורם המתיל הוא SAM (מסלול B באיור 1).
 2. אגירת MA מתרחשת בשלבי ההבשלה הסופים ובעיקר בפרי בשל מאוד. דיגום הפרי בטיפוח יעשה בפרי בשל לגמרי.
 3. אגירת החומצה האנתרנליטית (במסלול הסינתזה של טריפטופן) הינה הכרחית לסינתזת הנדיף MA והיא כנראה הגורם המגביל החשוב ביותר במניעת הצטברות הנדיף ברוב הזנים המסחריים.
 4. פעילות האנזים AAMT יעילה יותר בזן 660 משאר זנים שאינם צוברים MA.
 5. סינתזת MA המתרחשת בשלבי ההבשלה הסופים של הפרי מושפעת מטמפי' הגידול וכנראה מגורמים אחרים שאינם ידועים עדיין.



PFR STRAWBERRY SERVER

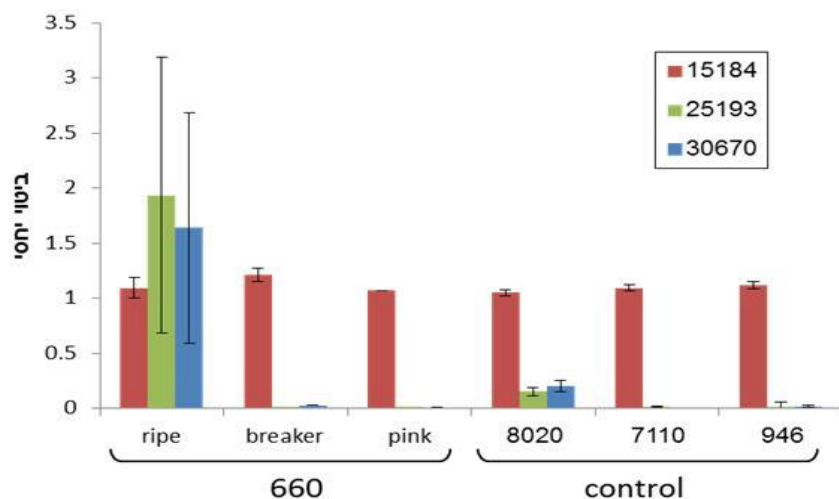
חיפוש גנים מקבוצת ה SABHAT המקטלזים את סינתזת MA בתות.

סיכום ממצאי השנה השנייה:

1. חיפוש Blast ראשוני בגנום התות הדיפלואידי (F. Vesca) בעזרת רצפי הגנים הידועים של תירס (חד פסיגי) ולוע הארי (דו פסיגי), העלה מספר גנים קנדידטים עם הומולוגיה טובה יחסית.
2. בהמשך עמיר ונועה (מהיחידה הביואינפורמטית של המנהל), זיהו 3 גנים קנדידטים לפעילות של מתיל טרנספראזות מתוך הטרנסקריפטום שהתפרסם המאמר של Chambers וחובריו, מפלורידה (טבלה 3).
3. שלושת הגנים הללו הם מתיל-טרנספראזות מקבוצת ה SAHABT המופיעים במקומות הראשונים באנליזת ה Blast וביטויים גבוהה בהרבה ב 660 (MDB) בהשוואה ל Aliana (טבלה 3). שלושת הגנים הללו וישמשו כגנים קנדידטים להמשך בדיקת פעילותם בסינתזת MA, מחומצה אנתרנליטית בתות שדה.
4. הביטוי הדיפרנציאלי של שלושת הגנים הקנדידטים בטבלה 3, בין הזן 660 לזנים מסחריים בישראל, נבדק ואושר ע"י אנליזת **qRT-PCR** (איור 5).

טבלה 3. ביטוי דיפרנציאלי של שלוש מתיל-טרנספראזות 25193, 30670 ו 15184, שנבחרו מתוך אנליזה טרנסקריפטומית שפורסמה ע"י Chambers וחובריו 2014, ונמצאו בעלי הומולוגיה גבוהה ל AAMT1 מתירס

Gene id	660 reads	'ELYANA' reads	Fold Change	pval	gene annotation
25193	1759.811	30.435	57.822	6.37E-12	Benzoate carboxyl methyltransferase
30670	767.995	19.900	38.593	2.57E-09	Jasmonate O-methyltransferase
15184	9452.578	1732.459	5.456	0.000372601	Jasmonate O-methyltransferase



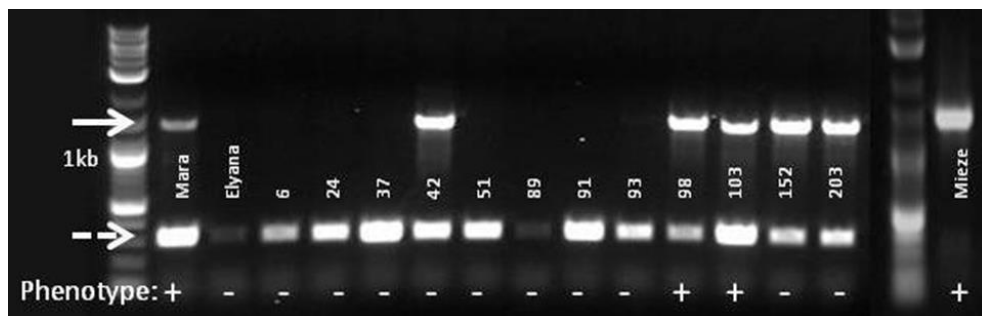
איור 5. qRT-PCR על cDNA, שהופק מפירות 3 זנים מסחריים ומשלושה שלבי הבשלת הפרי מהזן 660.

ניסיונות לביטוי פונקציונאלי של הגנים הקנדיזטים, לפעילות של AAMT, בחיידקים

הגנים 25193 ו-30670 נבחרו להמשך המחקר, והם הוכנו בצורה סינטטית, נחתכו ושובטו לפלסמיד ביטוי PET28. בחינת הפעילות האנזימטית של שני גנים אלו בוצעה ע"י שיבוטם לחיידקי *E. coli* משני מינים: 1. הפלסמיד הוכנס לחיידקי *E. coli* ArcticExpress לגידול והפקת חלבון. לחלבון, שהופק מהחיידקים, הוספו הסובסטרטים חומצה אנטרנילית ו-adenosyl-L-methyl¹⁴C]-Methionine- מסומן רדיואקטיבית. בדיקת נוכחות התוצרים נעשתה באמצעות קריאות רדיואקטיביות במונה סנטילציה. 2. הפלסמיד הוכנס לחיידקים מוץ *E. coli* W3110 *trpD9923* והחיידקים גדלו לתרבית סטציונרית. נוכחות תוצרי פעילות האנזימטית אפשריים, שנוצרו בתוך תאי החיידקים לאחר הוספת חומצה אנטרנליטית, נבדקה בשיטת GC-MS. לדאבוננו, בשתי שיטות הבדיקה לא התקבלו תוצאות המראות על פעילות האנזים. התוצאות אינן מוצגות.

הגן gene04119

במקביל למחקר שלנו התפרסמה עבודת המחקר של Alan Chambers בפלורידה. אלן מצא שהגן שמספרו 04119 בספריית הגנום של זן הבר *F. Vesca*, המקודד ל *Jasmonate O-methyltransferase*, נמצא באנליזת BLAST הומולוגי לגן מתירס, הוא הגן שכנראה מקטלו את המתילציה של חומצה אנתרנליטית ל MA. באיור 6, אפשר לראות, שהושגה התקדמות בפלורידה, וכל צאצא האוגר MA נושא את האלל הנותן ב PCR



את הבנד הגבוה (צאצאים 98 ו 103). לעומת זאת הסיפור לא שלם כי ישנם צאצאים המכילים את הבנד הגבוה אבל לא אוגרים MA (צאצאים 42,

איור 6. סמן מולקולרי לגן 04119 המוצג על DNA שהופק מהזן 660 (MARA), הזן המסחרי ELYANA, ואוכלוסיית צאצאים מתפצלת. למטה מוצג ב + צמחים האוגרים MA.

152 ו 203). המסקנה מניתוח הסמן הזה שיש כנראה שני לוקוסים (גנים) המשפיעים על התכונה לאגירת MA. כלומר בכדי לצבור MA צריכים לעבור מהזן 660 שני אללים לצאצאי ההכלאות עם הזן ELYANA.

סיכום הממצאים הגנטיים עולה בקו אחד עם תוצאות לימוד מסלול סינתזת MA ושל הטיפוח שנמצאו בעבודה זו. **התכונה לאגירת MA כנראה נרכשת ע"י שני גנים**, אחד הוא מתיל-טרנספראז שגן 04119 הוא כנראה מקדד לאנזים המעביר מתיל לחומצה אנתרנליטית מ SEM. והשני כנראה מעורב בסינתזה של חומצה אנתרנליטית במסלול החומצה השיקומית לסינתזת טריפטופן. ולכן השלב הראשון באפשרות לאגור MA בפרי הוא השלב הקריטי והחשוב בו נצברת החומצה (המבוקר כנראה ע"י הגן השני) והשלב השני הוא הפיכת החומצה ל MA ע"י AAMT.

סיכום ממצאי המחקר והטיפוח

במהלך הטיפוח נבדקו מספר רב של קווים המכילים MA לציבות התכונה ולמדדי צמח נוספים. בנוסף נסרקו בעונות 2013 ו 2015 אוכלוסיות צאצאי הכלאות בין אחים ונבררו צמחים נוספים המכילים רמות גבוהות ובינוניות של MA. בעונת 2015 נמצאו כבר מספר קווים המשלבים רמה מורגשת של MA עם צמחים יפים בעלי פירות אחידים בגודל בינוני עם חיי מדף משופרים בהרבה. הקווים MC32 ו MC38-8 נבחרו כטובים ביותר, אותם נגדל בשנה הבאה בחלקות חצי מסחריות בכדי לבדוק את ביצועיהם החקלאיים ואת תגובת הצרכנים לפרי המיוחד בעל ארומת ענבים. שלושת שנות הטיפוח לארומה המיוחדת הוכיחו שדבר אפשרי אם כי איטי יותר מטיפוח רגיל. ההורה התורם את התכונה מביא איתו הרבה תכונות שליליות ודרוש אוכלוסיות גדולות יותר והרבה צירופים כדי לחזור ולקבל קווים מסחריים האוגרים MA.

לאחר זיהוי המסלול הביוכימי בו מועבר מתיל מ SAM לחומצה האנתרנליטית (AA) ליצירת MA ככזה המתועד בתירס מצאנו גנים (AAMT) קנדידטים שתבנית ביטויים מקביל לסינתזת MA בפרי הזן 660 (איור 5). שלושת הגנים לא הראו פעילות עם חומצה אנתרנליטית לאחר ביטויים בחיידקים. במקביל נמצא בפלורידה הזן 04119 שכן מקטלז את העברת המתיל לחומצה אנתרנליטית מ SAM. ממצאי עבודה עולה כי פעילות הגן מתיל-טרנספראז זה, בצאצא ספציפי אינו מספיק בכדי לאגור MA ויש עוד גן שנמצא בהורה 660 שכנראה מבקר את צבירת החומצה האנתרנליטית כגורם מגביל נוסף לאגירת MA. כלומר צבירת חומצה אנתרנליטית (AA) בפרי היא הגורם המגביל הראשון ביכולת לסינתזה ואגירה של MA בפרי. בזנים המסחריים אין צבירת AA כלל ולכן אין סובסטאט לסינתזת MA בהם. השאלה מה גורם להצטברות AA בפרי עדין פתוחה ולימוד המסלול בו היא נוצרת בפרי נלמד בהמשך. סמן PCR, שהוכן, על סמך גן 04119 יכול לעזור באופן חלקי לברירת צאצאים בטיפוח. ברירה טובה יותר בכלים מולקולריים תעשה רק לאחר מציאת הגן השני המבקר את תכונת האגירה וכך ברירת צאצאים המכילים את שני האללים החיוניים לצבירת MA בפרי תות שדה.

<p>1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</p>
<p>א. ביצוע תכנית טיפוח נרחבת ואנליזות GC רבות.</p>
<p>ב. לימוד תאחיזה בין אגירת MA לתכונות צמח ופרי נוספות ברמה הפנוטיפית.</p>
<p>ג. לימוד המסלול הביוכימי בו נוצר Methyl Anthranilate בתות שדה.</p>
<p>ד. בחינת גנים קנדידים מקבוצת ה SABHAT לפעילות של מתיל טרנספראז וכמבקרים את סינתזת MA בתות-שדה.</p>
<p>2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</p> <p>במהלך 3 שנות המחקר ביססנו תכנית טיפוח המשלבת הכלאות רבות בין אחים המכילים MA. נלמדה יציבות התכונה בקווים נבחרים ואופי ההצטברות של MA במהלך הבשלת הפרי. מצאנו שהצטברות הנדיף מתרחשת רק בשלבי הבשלה סופים ומושפעת מטמפל' הגידול וגורמים נוספים שעדיין אינם ידועים. הקווים MC32 ו MC38-8 נבחרו כטובים ביותר, אותם נגדל בשנה הבאה בחלקות חצי מסחריות.</p> <p>סינתזת MA בפרי מקבילה להצטברות חומצה אנתרנליטית בו. ממצא זה מצביע על גורם מגביל נוסף ואולי אף עיקרי ביכולת הצבירה של הנדיף MA. אגירת החומצה האנתרנליטית שאינה מתרחשת ברוב זני התרבות המסחריים עשויה להיות גורם חשוב וקריטי לסינתזת MA, אף יותר מפעילות האנזים AAMT.</p> <p>שלושת הגנים קנדידים, שבודדו ונבדקו לפעילות מתיל טרנספראז בפרי אינם פעילים עם חומצה אנתרנליטית לקבלת MA.</p>
<p>3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרת המחקר בתקופת הדו"ח.</p> <p>אגירת MA מתרחשת בשלבי ההבשלה הסופים ובעיקר בפרי בשל מאוד. דיגום הפרי בטיפוח יעשה בפרי בשל לגמרי הגדלת אוכלוסיות הטיפוח, חזרה להכלאות ראשוניות המשלבות הורים מסחריים והכנסת זנים נוספים מהעולם האוגרים MA, הם שלבים הכרחיים בכדי להתקדם לזן מסחרי בעל פרי גדול האוגר MA.</p> <p>המסקנה שאגירת החומצה האנתרנליטית, שאינה מתרחשת ברוב זני התרבות המסחריים, עשויה להיות גורם חשוב וקריטי לסינתזת MA, אף יותר מפעילות האנזים AAMT. נתמכת גם ממחקר גנטי בו נמצאה התכונה כמבוקרת משני גנים וסמן לגן 04119 למתיל-טרנפראז, שנוכחותו לבד אינה מספיקה לאגירת MA.</p> <p>ביטוי הגנים הקנדידים לסינתזת MA אושש ב RT-PC, אך בבדיקת פעילותם לאחר שיבוטם בחידקים נשללה מעורבותם בסינתזת MA.</p> <p>בשנה האחרונה בררנו קווים כדוגמת MC32 ו MC38-8 שיכנסו בשנה הבאה למספר חלקות חצי מסחריות.</p>
<p>4. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</p> <p>תוצאות המחקר פורסמו בהרצאה בכנס של האגודה האמריקאית לתות-שדה (NASS) שהתקיים פברואר 2015 בוונטורה קליפורניה, ביום עיון על איכות תוצרת חקלאית של המכון למדעי הצמח ודוגמאות פרי חולקו ביום הפתוח האחרון בוולקני.</p>
<p>5. פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח (סמן אחת מהאופציות) <ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) > V <u>ניתן לפרסם ללא הגבלה</u> <חסי לא לפרסום: יש לצרף מכתב הסבר –</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן *לא-</p>

